

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

# **SIGNALNI PUTEVI U KARCINOGENEZI** **TUMORA**

## **SIGNAL PATHWAYS IN TUMOR** **CARCINOGENESIS**

**SEMINARSKI RAD**

Josipa Mateševac  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2017.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. NOTCH SIGNALNI PUT.....	3
2.1. Uloga u karcinogenezi.....	3
2.2. Terapija i liječenje.....	6
3. HEDGEHOG SIGNALNI PUT.....	7
3.1. Uloga u karcinogenezi.....	7
3.2. Terapija i liječenje.....	9
4. WNT SIGNALNI PUT.....	10
4.1. Uloga u karcinogenezi.....	10
4.2. Terapija i liječenje.....	12
5. TGF- $\beta$ SIGNALNI PUT.....	13
5.1. Uloga u karcinogenezi.....	13
5.2. Terapija i liječenje.....	15
6. SPAJANJE UGODNOG S KORISNIM: ČAJ KAO OBLIK KEMOPREVENCIJE TUMORA.....	16
7. ZAKLJUČAK.....	18
8. LITERATURA.....	19
9. SAŽETAK.....	23
10. SUMMARY.....	23

## 1. UVOD

Karcinogeneza (drugi naziv tumorigeneza) je pojam koji označava proces nastanka tumora, tipičan za tkiva u kojima je stanična homeostaza poremećena. Postoji mnogo faktora koji narušavaju normalan rast i diobu stanica, među kojima su nasljedni poremećaji, starenje (Kato i Kato 2007), imunološka deficijencija i hormonska neravnoteža. Razvitku tumora znatno pridonose i okolišni faktori: zračenje, kemikalije, virusi, ali i životne navike kao pušenje, alkohol, izlaganje suncu i prehrana.

(<http://www.encyclopedia.com/medicine/diseases-and-conditions/pathology/carcinogenesis>)

Razvoj tumora je proces od više koraka koji uključuju inicijaciju tumora, promociju, malignu transformaciju i progresiju. Sam proces može biti vrlo dugotrajan, a rezultat je nakupljanja mutacija koje rezultiraju promijenjenim produktima gena. Nastanak tumora posljedica je greški u regulaciji i strukturnih promjena uobičajenih staničnih puteva. (<http://www.med-college.de/en/wiki/artikel.php?id=43>)

Stanična signalizacija odgovorna je za kontrolu staničnih aktivnosti i koordinaciju staničnih odgovora. Narušavanje tih puteva dovodi do razvoja raznih bolesti i raka. Razumijevanje stanične signalizacije čini prvi korak liječenju bolesti (<http://www.rockland-inc.com/cell-signaling-pathways.aspx>)

Kao posljedica razumijevanja promjena u signalnim putevima koje dovode do razvoja tumora, javlja se koncept ciljanih terapija koje djeluju na proteine uključene u kontrolu proliferacije stanica, migracije ili preživljavanje. Za razliku od klasične kemoterapije u kojoj se liječi posljedica promjene koja je izazvala rak, ciljane terapije djeluju na uzrok (Robert 2010).

Mnogo je signalnih putova uključeno u nastanak tumora, a u ovom ću seminaru pokušati objasniti najvažnije puteve, receptore uključene u prijenos signala, ali i dati uvide u moguće načine liječenja i sprječavanja nastanka tumora.

## 2. NOTCH SIGNALNI PUT

### 2.1. Uloga u karcinogenezi

Evolucijski sačuvana Notch signalizacija uključena je u određivanje stanične sudbine tijekom embriogeneze i u odraslim tkivima (Cappacione i Pine 2013). Ima ulogu u održavanju populacije matičnih (progenitorskih) stanica, ali i u održavanju ravnoteže između proliferacije, diferencijacije i apoptoze stanica (Miyamoto i sur. 2013). Neodgovarajuća aktivacija dovodi do nastanka signala koji stimuliraju proliferaciju stanica, dovodi do ograničene diferencijacije i sprječavanja apoptoze tumorskih stanica (Rizzo i sur. 2008). U mnogim tumorima postoji Notch prekomjerna ekspresija ili konstitutivna ekspresija, kao posljedica pogrešne regulacije (Cappacione, Pine 2013), stoga se inaktivacija Notch-a smatra mogućom terapijom na molekularnom nivou (Qiao i Wong 2009). Kod mnogih tumora donosi prednost u preživljavanju malignih stanica što rezultira lošijom prognozom za pacijente (Cappacione i Pine 2013).

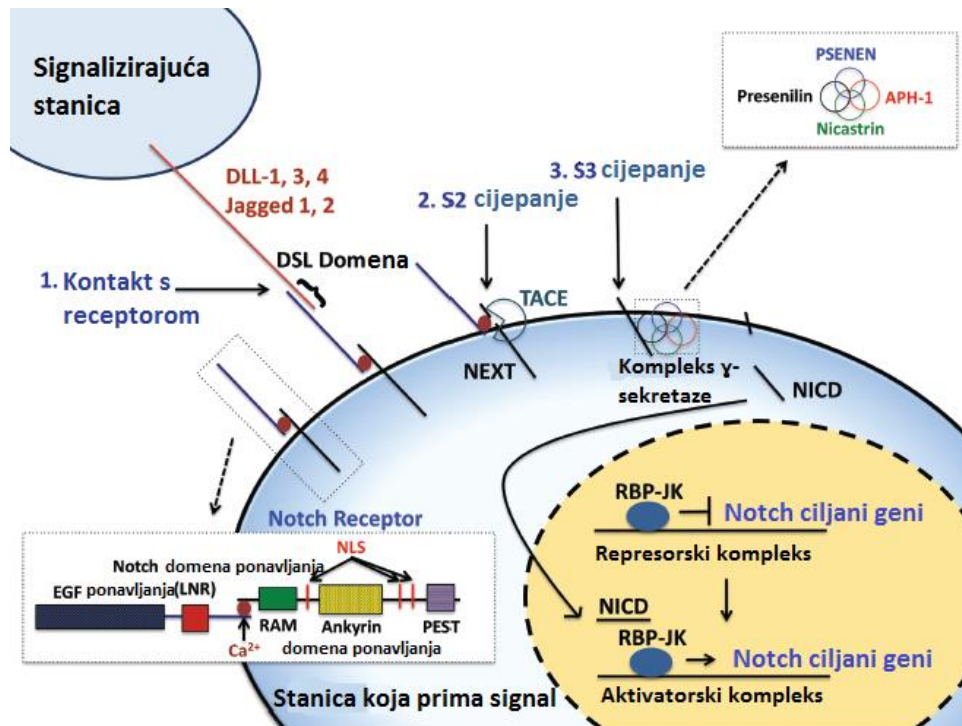
Istraživanja pokazuju kako aktivna Notch signalizacija pomaže u održavanju tumorskih matičnih stanica i promicanju kemorezistencije (Cappacione i Pine 2013). Tumorske matične stanice (tumor inicirajuće stanice) izvor su glavnine tumorskih stanica kroz nekontroliranu diferencijaciju, velikim dijelom nalik na stanice normalnih tkiva (Rizzo i sur. 2008). Sudjeluju u inicijaciji i progresiji tumora, kao i povratku tumora nakon izliječenja (Qiao, Wong 2009). Njihova su svojstva neograničeno samoobnavljanje kao rezultat asimetričnih dioba stanica, mala brzina proliferacije i visoka razina ekspresije ABC-prijenosnika, zahvaljujući kojoj su otporne na toksične spojeve (Rizzo i sur. 2008).

Notch je prvi puta otkriven u vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), a naziv je dobio prema fenotipu mutanata kod kojih su krila bila reckasta (Guo i sur. 2014). Analize su pokazale kako se Notch sastoji od 2703 aminokiselina te da je transmembranski proteinski receptor (Cappacione i Pine 2013) tipa I koji posjeduje transmembransku domenu za učvršćivanje u staničnoj membrani (Guo i sur. 2014) i transkripcijski faktor koji sadrži unutarstaničnu domenu sa slijedom za lokalizaciju u jezgri (Cappacione i Pine 2013).

Kod sisavaca nalazimo 4 Notch receptora (Notch 1-4) koji se malo razlikuju u izvan- i unutarstaničnim domenama (Dumont i sur. 2012). Za njihovu je funkcionalnost nužna posttranslacijska obrada. Cijepanje proteazom na S1 mjestu proizvodi zreli heterodimerni

receptor u kojem su monomeri nekovalentno povezani kalcijevim kationima koji inhibiraju sam protein (Cappacione i Pine 2013). Aktivacija signalizacije rezultat je vezanja liganda iz porodice Jagged (Jagged 1 i 2) i Delta-like (DLL-1, DLL-3 i DLL-4) na signalizirajućoj stanici na receptor u membrani susjedne stanice (Qiao, Wong 2009). Vezanje uzrokuje konformacijsku promjenu kojom se izlaže i cijepa S2 mjesto (Cappacione i Pine 2013). Preostali fragment cijepa kompleks gama-sekretaze, u ključnom koraku pri čemu se oslobađa Notch unutarstanična domena (NICD, od engl. *Notch intracellular domain*), aktivni oblik Notch-a (Qiao, Wong 2009), koja translocira u jezgru i aktivira te modificira transkripciju gena (Ma i sur. 2005). Signalni put prikazuje Slika 1. Signalna kaskada Notch ligand interakcija ne uključuje amplifikaciju signala (Rizzo i sur. 2008) i ne postoje sekundarni glasnici (Cappacione i Pine 2013).

Notch ICD se veže na RBP-J $\kappa$  (engl. *Recombining binding protein J-kappa*), proteinski kompleks vezan na DNA koji je prisutan u ljudi (Cappacione i Pine 2013) čime nastaje kompleks aktivator transkripcije (Qiao i Wong 2009). Ukoliko se aktivirana unutarstanična domena ne veže, RBP-J $\kappa$  djeluje kao transkripcijski represor (Ma i sur. 2005). Ukoliko dolazi do vezanja, kompleks postaje konstitutivni aktivator uklanjanjem prethodno vezanih korepresora i novačenje koaktivatora (Qiao i Wong 2009), čime započinje transkripcija ciljanih gena (Cappacione i Pine 2013).



**Slika 1.** Prikaz Notch signalnog puta. Međudjelovanje liganda i receptora dovodi do dva cijepanja receptora. Prvo cijepanje posredovano je faktorom nekroze tumora- $\alpha$  konvertirajućim enzimom (TACE), a drugo kompleksom gama-sekretaze. Oslobođena unutarstanična domena (NICD) odlazi u jezgru gdje se veže za RBP-J $\kappa$  proteinski kompleks koji uzrokuje njegov prijelaz iz represora u aktivator transkripcije Notch ciljanih gena. Izvanstanična domena sadrži 36 uzastopnih ponavljanja homologna epidermalnom faktoru rasta (epidermal growth factor-EGF) koji međudjeluju s ligandom, LNR (negativna regulatorna regija) negativno regulira aktivnost dok RAM domena pojačava međureakcije između NICD i RBP-J $\kappa$ , PEST domena je uključena u degradaciju NICD. Preuzeto iz Cappacione i Pine 2013.

Nenormalna Notch signalizacija prvi je put otkrivena kod akutne limfoblastične leukemije T-stanica 1991. godine. U čak 50 posto slučajeva bila je prisutna nenormalna aktivacija Notch1 (Qiao i Wong 2009). Kromosomska translokacija rezultirala je okrnjenim proteinom kojem je nedostajala većina izvanstanične domene (Miyamoto, Nakanishi, Rosenberg 2013). Saznanja o točnom načinu djelovanja dolaze tek kasnije kada je otkriveno kako je direktna meta Notch1 gen koji kodira MYB, proto-onkogen koji potiče pojačanu diferencijaciju i smanjenu apoptozu (Cappacione i Pine 2013).

Poremećana Notch signalizacija prisutna je kod karcinogeneze mnogih tumora, među kojima su rak gušterače, prostate, jetre, vrata maternice, pluća, jajnika, debelog crijeva i dojke. Kod nekih tumora dojke i raka prostate pretjerana ekspresija Notch-a povezana je s lošom prognozom i slabim odgovorom na liječenje (Qiao i Wong 2009).

Notch4 otkriven je kod raka dojke izazvanog virusom kod miša. Korištenje ljudskih staničnih linija raka dojke pokazalo je kako one u usporedbi s normalnim stanicama imaju povećanu akumulaciju Notch1 ICD. U takvim je stanicama bio blokiran put odgovora na oštećenje DNA i one nisu bile u mogućnosti završiti apoptozu (Cappacione i Pine 2013).

Pokazalo se kako je Notch signalizacija uključena u održavanje normalnog epitela probavnog sustava, gdje utječe na diferencijaciju stanica te održava razvoj i homeostazu. U stanicama primarnog kolorektalnog karcinoma ligand Jagged1 eksprimiran je u mnogo većoj mjeri u usporedbi s normalnim stanicama. Također je pokazano kako je Notch važan u procesu angiogeneze (Guo i sur. 2014). Progresivni razvoj i metastaziranje kolorektalnog karcinoma uvelike ovise o vaskularnoj opskrbi hranjivim tvarima (Qiao i Wong 2009).

Notch ima dvojnu prirodu (Dumont i sur. 2012) i ovisno o tipu stanica, staničnom okruženju i opsegu aktivacije (Qiao i Wong 2009) može djelovati kao i tumor supresor. Biološke osobitosti tog signalnog puta objašnjavaju ovo svojstvo, budući da Notch signalizacija sudjeluje u diferencijaciji u jednim tkivima, a održavanju fenotipa matičnih stanica u drugima. Tumor supresorska uloga primjećena je kod nekih neuroendokrinih tumora, raka pluća malih stanica i kronične mijelocitne leukemije (Dumont i sur. 2012).

## **2.2. Terapija i liječenje**

Notch signalizacija može se liječiti inhibitornom terapijom u kojoj se koriste inhibitori  $\gamma$ -sekretaze (GSI, od engl. *gamma-secretase inhibitors*) ili Notch protutijela. Loša strana korištenja GSI su toksični učinci na ostatak organizma koji uključuju slabost, povraćanje i umor kao posljedicu neselektivne inhibicije Notch receptora (Guo i sur. 2014), stoga je potrebno odrediti razinu inhibicije dovoljnu za učinkovitost u kontroli tumora bez naželnih štetnih učinaka (Rizzo i sur. 2008). Korištenje protutijela rezultiralo je smanjenom ekspresijom Notch receptora (Guo i sur. 2014).

Moguće je narušiti međureakcije ligand-receptor koristeći receptorske „mamce“ ili sprječavanjem konformacijske promjene inducirane ligandom koja je potrebna za aktivaciju receptora. Postoji i mogućnost korištenja RNA (miRNA i siRNA) kojima bi se mogla kontrolirati razina ekspresije Notch ciljanih gena što predstavlja nove obećavajuće pristupe u eksperimentalnoj terapiji (Rizzo i sur. 2008).

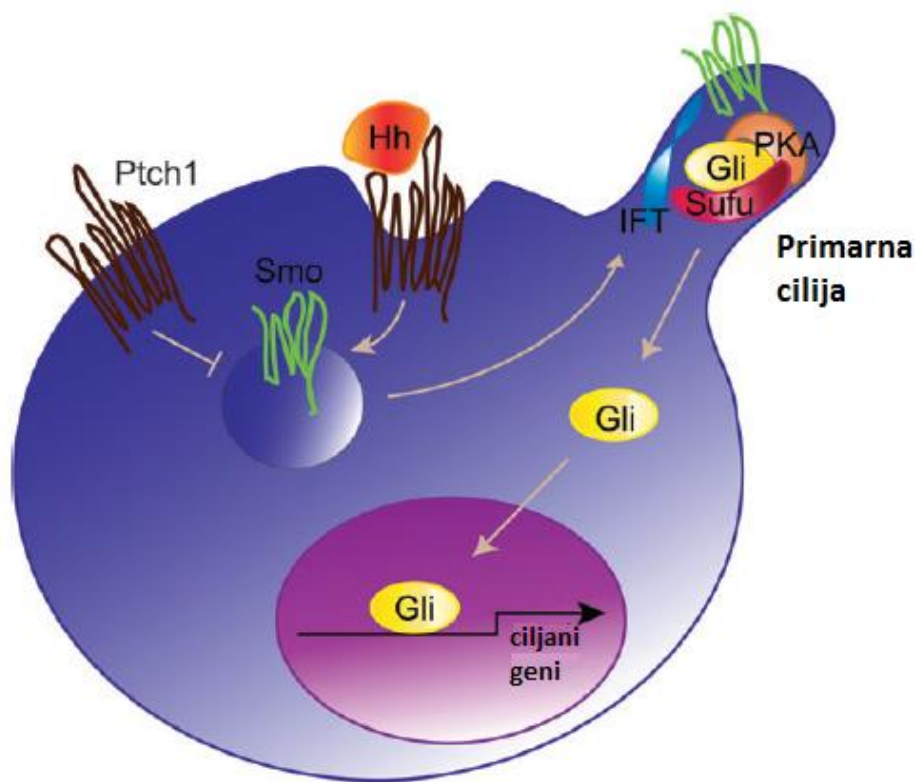
### 3. HEDGEHOG SIGNALNI PUT

#### 3.1. Uloga u karcinogenezi

Hedgehog (Hh, jež) je prvi puta otkriven kod mutanti vinske mušice. Gubitak funkcije gena dovodio je do razvoja mutantnog embriogenog fenotipa gdje su embriji razvijali projekcije nalik na ježeve bodlje (Kelleher 2010). Tijekom normalnog razvoja, Hh signalni put sudjeluje u proliferaciji stanica (Liao i sur. 2009), polarnosti tkiva (Ma i sur. 2005) i njihovoj diferencijaciji u različite organe. U odrasloj dobi djeluje kao regulator aktivnosti matičnih stanica, stimulirajući samoobnavljanje u mnogobrojnim tkivima (Gupta i sur. 2010).

U sisavaca postoje 3 hedgehog gena koji kodiraju za ligande: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog i Desert Hedgehog (Liao i sur. 2009). Oni su eksprimirani u različitim tkivima i u različitim stadijima razvoja (Gupta i sur. 2010). Sonic HH je razvojni morfogen u ljudi uključen u formiranje gradijenta koji određuje razvoj udova (Kelleher 2010) i važan signal tijekom razvoja probavila u kralježnjaka (Ma i sur. 2005). Ukoliko ligandi nisu prisutni, signalni je put inaktiviran (Liao i sur. 2009). Vezanjem bilo kojeg od ova tri liganda na transmembranski proteinski receptor Patched (Ptch) (Kelleher 2010) dolazi do aktivacije signalne kaskade. Prestaje inhibicija drugog transmembranskog receptora (Liao i sur. 2009) i proto-onkoproteina (Sicklick i sur. 2006) Smoothened (Smo) i dolazi do otpuštanja i translokacije transkripcijskih faktora Gli (Gli1, Gli2 i Gli3) koji posjeduju domenu s cinkovim prstima u jezgri. Tamo dolazi do aktivacije ciljanih gena (Liao i sur. 2009) koji utječu na proliferaciju i preživljavanje stanica (Gupta i sur. 2010). Slika 2. prikazuje aktivaciju Hh puta. Gli1 i Gli2 djeluju kao aktivatori, dok Gli3 djeluje uglavnom kao represor (Kasper i sur. 2009). Gli transkripcijski faktori djeluju na mnoge nizvodne gene, među kojima su VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta) koji sudjeluje u angiogenezi, transformirajući faktor rasta, ciklini i drugi, od kojih neki djeluju kao onkogeni (Dormoy i sur. 2012).





**Slika 2.** Pojednostavljen prikaz Hedgehog signalizacije koja se u sisavaca odvija u nepokretnim cilijama (Gupta, Takebe i sur. 2010). Put je inaktivan u odsutnosti liganda. Vezanje liganda deaktivira Ptch1, inhibitora aktivnosti proteina Smo lociranog na membrani unutarstaničnog endosoma, što dovodi do prestanka repesije Smo. Signalna kaskada dovodi do translokacije transkripcijskih aktivatora Gli u jezgru. Preuzeto iz Kasper i sur. 2009.

Nekontrolirana aktivacija, mutacija ili deregulacija Hedgehog signalnog puta pronađena je kod raka mozga, pluća (Gupta, Takebe i sur. 2010), prostate, gušterače, jajnika i malignih tvorbi gastrointestinalnog sustava (Liao i sur. 2009). Otkriveno je kako ima ulogu u nastanku i progresiji raka jajnika. Nadekspresija Gli1 i Patched povezana je s lošim šansama izlječenja kod pacijenata, velikim dijelom zbog toga što Gli1 inhibira apoptozu i promiče angiogenezu (Liao i sur. 2009). Ekspresija Ptch i Smo pronađena je u stanicama raka jetre. Otkrivanje učinka na karcinogenezu olakšano je zbog činjenice da zdravi odrasli hepatociti ne eksprimiraju proteine Hh signalnog puta. Jačina ekspresije proteina Smo izravno korelira s veličinom nastalog tumora (Sicklick i sur. 2006).

### 3.2. Terapija i liječenje

Pokazalo se kako inhibicija Hh signalnog puta djeluje suprimirajuće na rast tumorskih stanica, njihovu sposobnost invazije okolnih tkiva i staničnu pokretljivost. Također dovodi do indukcije programirane stanične smrti i dediferencijacije (Liao i sur. 2009). Prvi korišteni inhibitor Hedgehog signalnog puta bio je ciklopamin, biljni alkaloid koji djeluje inaktivacijom Smo transmembranskog receptora. Zbog lošeg afiniteta, male prirodne dostupnosti i suboptimalnog djelovanja, kasnije je zamijenjen malim sintetskim molekulama (Gupta i sur. 2010).

Kolekalciferol, prekursor aktivnog vitamina D3 djeluje kao inhibitor Shh-Gli signalizacije, smanjujući proliferaciju i potičući smrt stanica. Drugi oblik vitamina D3, kalcitriol, koji sudjeluje u održavanju mineralne homeostaze također pokazuje ista svojstva (Dormoy i sur. 2012). Isti je cilj djelovanja kod liječenja AML (akutne mijeloidne leukemije) gdje je otkriveno kako Hh-Gli signalni put, osim u regulaciji inicijatorskih stanica leukemije, ima i važnu ulogu u razvoju otpornosti na lijekove (Aberger i sur. 2017).

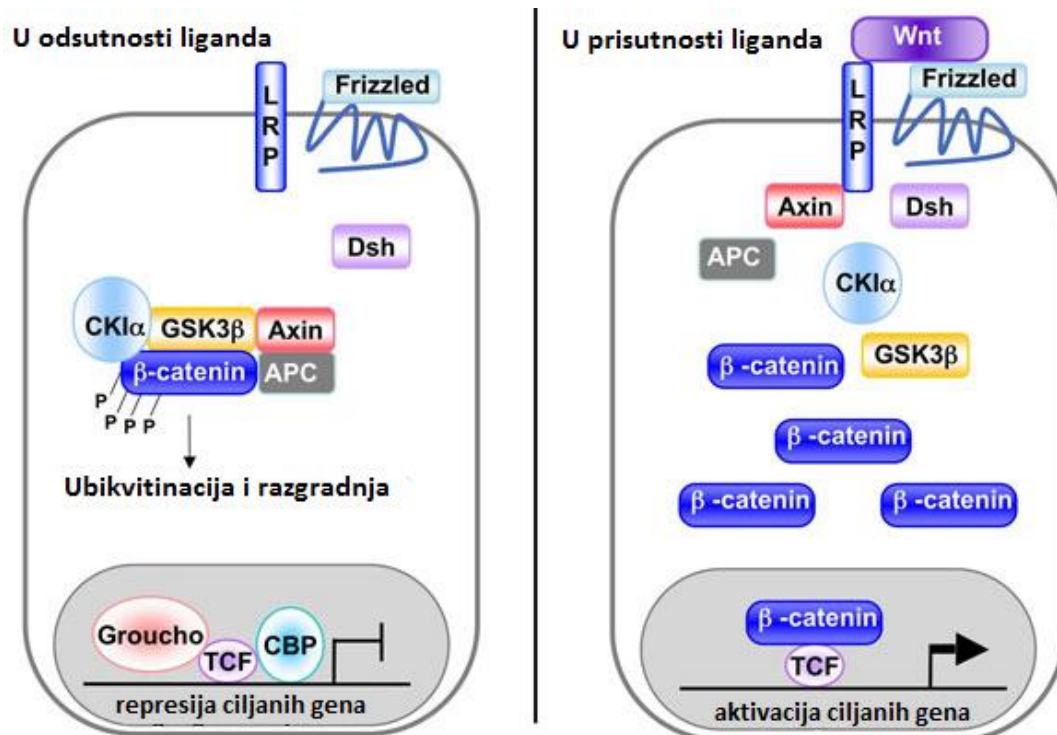
Detaljni mehanizmi djelovanja Hedgehog signalizacije još uvijek su nepoznati i zahtijevaju daljnja istraživanja. Budući da u različitim tipovima tumora može biti aktivirana različitim mehanizmima, razumijevanje specifičnog djelovanja u određenim tumorima može pomoći kod odabira optimalne strategije liječenja putem inhibicije signalnog puta (Gupta i sur. 2010).

## 4. WNT SIGNALNI PUT

### 4.1. Uloga u karcinogenezi

Evolucijski sačuvana (Novellasdemunt i sur. 2015) Wnt signalizacija ima ulogu u kontroli stanične proliferacije, pokretljivosti, morfologije, embrionalnog razvoja i održavanju tkivne homeostaze regulacijom matičnih stanica. Abnormalna regulacija vodi razvoju neoplastičnih tvorbi (Li i sur. 2015). Wnt proteini mogu djelovati kanonskim ( $\beta$ -katenin ovisnim) putem, koji određuje staničnu sudbinu, ili nekanonskim ( $\beta$ -katenin neovisnim) putem zaslužnim za kontrolu pokretljivosti stanica i polarnost tkiva (Kato i Kato 2007). Kod njega se signal prenosi polarnim putevima i GTP-aznim proteinima i o njemu ovdje neće biti govora (Li i sur. 2015).

U ljudi postoji 19 gena iz Wnt porodice (Slika 3.), koji kodiraju evolucijski sačuvane glikoproteine – ligande (Kato i Kato 2007). U odsutnosti liganda,  $\beta$ -katenin stvara kompleks s APC i AXIN proteinima gdje ga fosforilira CKI $\alpha$  (kazein kinaza I $\alpha$ ) i GSK3 $\beta$  (kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$ ). Nakon toga slijedi ubikvitinacija E3-ligazom (Basu, Haase i sur. 2016) i razgradnja (Slika 3.). Ligandi započinju signalizaciju vezanjem na izvanstaničnu N-terminalnu regiju Frizzled (FZD) transmembransih receptora i LRP5/LRP6 (proteini povezani s receptorom proteina niske gustoće; engl *low-density-lipoprotein receptor-related protein*) koreceptora (Li i sur. 2015). LRP fosforiliraju CKI $\alpha$  i GSK3 $\beta$  čime se privlači proteini Dishevelled (Dsh) koji se aktiviraju polimerizacijom (Zhan i sur. 2017).  $\beta$ -katenin se stabilizira i nakuplja u jezgri gdje stvara kompleks s porodicom transkripcijskih faktora TCF (faktor T-stanica) i aktivira transkripciju uklanjanjem represora (Kato i Kato 2007). Pokazalo se kako visoka koncentracija glukoze, čija je povišena potrošnja obilježje tumorskih stanica, dovodi do pojačane translokacije  $\beta$ -katenina u jezgru (Lecarpentier i sur. 2017).



**Slika 3.**  $\beta$ -katenin ovisan Wnt signalni put. U odsutnosti signala kompleks za uništenje kojeg čine CK1 $\alpha$ , GSK3 $\beta$ , APC i Axin hiperfosforilira  $\beta$ -katenin koji se potom ubikvitinira i proteosomalno razgrađuje. Vezanje liganda na receptoski kompleks Frizzled/LRP-5/6 stabilizira  $\beta$ -katenin uslijed čega dolazi do interakcije s TCF proteinima u jezgri i aktivacije transkripcije ciljanih gena. Preuzeto sa [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling/wntsignaling.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html)

Mutacije koje rezultiraju gubitnom funkcije, kao i epigenetičko utišavanje negativnih regulatora WNT signalnog puta prisutne su u mnogim ljudskim tumorima (Katoh i Katoh 2007). Gubitak funkcije proteina APC rezultira pojačanom TCF signalizacijom, a prisutan je kod raka jetre (Polakis 2012) i kolorektalnog raka. Eksperimenti su pokazali kako je uslijed ponovne uspostave APC funkcije u stanicama probavila došlo do regresije malignog u normalno tkivo (Zhan i sur. 2017). U stanicama kolorektalnog raka nađeni su i mutirani AXIN proteini koji djeluju kao negativni Wnt regulatori i tumor supresori (Novellademunt i sur. 2015). Kod leukemije također postoji znatno povišena razina aktivnosti Wnt signalizacije. U stanicama kronične limfocitičke leukemije *in vitro* inhibicija uzrokuje apoptozu tumorskih stanica. Kod raka dojke Wnt signalizacija povezana je sa smanjenim šansama preživljavanja. Povišene razine  $\beta$ -katenina nađene su različitih podtipova (Zhan i sur. 2017). Transkripcijska

aktivacija Wnt signalizacije zbiva se i prilikom procesa regeneracije tkiva uslijed kronične upale (Kato i Kato 2007).

#### **4.2. Terapija i liječenje**

Povećana ekspresija Wnt proteinskih liganda i smanjena ekspresija Wnt inhibitora zbiva se u početku karcinogeneze. Kako je kronična perzistentna upala uzrok raznih tumora, primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova predstavlja jedan oblik borbe protiv razvoja malignosti (Kato i Kato 2007). Eksperimentalna istraživanja pokazuju kako aspirin ima kemopreventivni učinak na razvoj tumora inhibicijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalizacije. I prirodni proizvodi kao što su flavonoidi učinkoviti su protiv tumora. Primjer je fisetin koji pripada u podskupinu flavonola, a nalazi se u mnogom voću i povrću (Li i sur. 2015). Vitamin A također smanjuje razinu  $\beta$ -katenina (Novellasmunt i sur. 2015).

PPAR- $\gamma$  (peroksisomskim proliferatorom aktivirani receptor gama) koristi se kao agonist Wnt signalizacije te se smatra kako rana obrada može spriječiti razvoj tumora zahvaljujući svojstvu sprječavanja proliferacije i diferencijacije stanica, a primjenjuje se u liječenju kolorektalnog raka (Lecarpentier i sur. 2017).

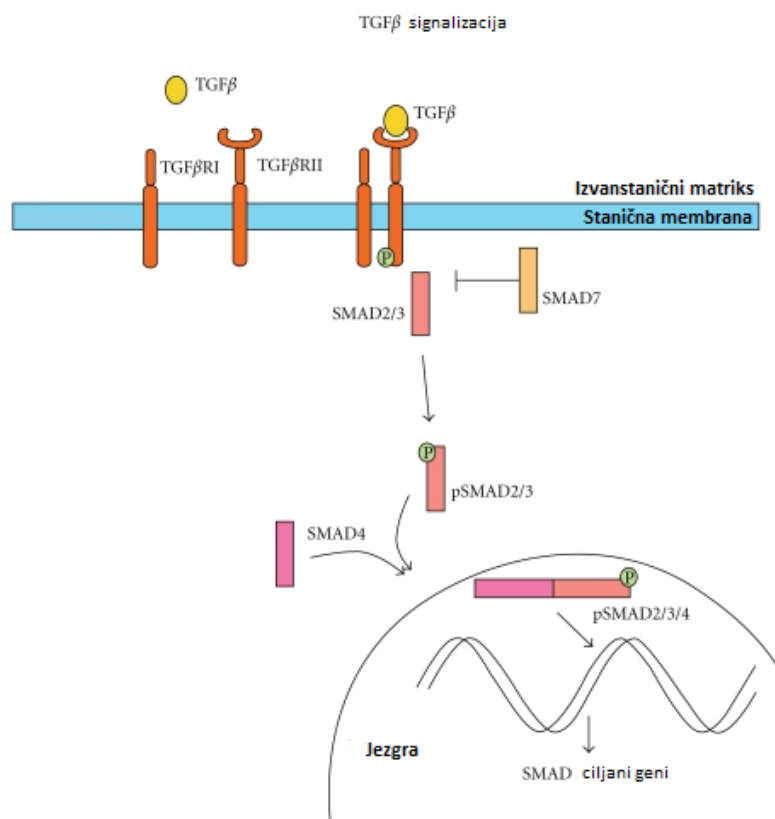
Trenutno se razvijaju novi lijekovi koji bi djelovali na izvanstanične Wnt ligande i njihove receptore. Kako cijeli mehanizam signalizacije još uvijek nije potpuno poznat, potrebna su daljnja istraživanja i klinička ispitivanja koja bi dala strategije kojima bi se moglo specifično djelovati na pojedine mutacije ili vrste tumora (Zhan i sur. 2017). Budući je Wnt signalizacija uključena u održavanje homeostaze matičnih stanica i regeneraciju tkiva, posebice u gastrointestinalnom epitelu, epitelu kože (Li i sur. 2015) i dlačnim folikulima, posljedica djelovanja na tumorske stanice je i znatna nespecifična toksičnost za zdrave stanice (Novellasmunt i sur. 2015).

## 5. TGF- $\beta$ SIGNALNI PUT

### 5.1. Uloga u karcinogenezi

TGF- $\beta$  (transformirajući faktor rasta  $\beta$ ) sudjeluje u kontroli proliferacije stanica, diferencijacije tkiva, apoptoze, kao i migracije normalnih i tumorskih stanica. Djeluje kao tumor supresor u premalignom razvoju tumora (Yokobori i sur. 2017) i kao onkogen tijekom invazije i mezastaziranja (de Caestecker i sur. 2000). Ima sposobnost inhibiranja proliferacije mnogih normalnih staničnih tipova, stoga ne čudi što su brojne tumorske linije otporne na njegovo djelovanje. Osnova za tu otpornost su funkcionalna inaktivacija receptora ili nizvodnih signalnih molekula (Derynck i Feng 1997) mutacijama ili poremećenom ekspresijom (de Caestecker i sur. 2000).

TGF- $\beta$  je homodimerni polipeptid (Novitskiy i sur. 2014), a u sisavaca pronalazimo tri izoforme TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3 ligande (de Caestecker i sur. 2000). Slika 4. pokazuje pojednostavljeni prikaz signalnog puta. Vezanjem na receptore dolazi do fosforilacije Smad2 i/ili Smad3 (Yokobori i sur. 2017) koji tvore kompleks sa Smad4 i translociraju u jezgru gdje dolazi do regulacije transkripcije ciljanih gena. Neki od njih potiču metastaziranje, angiogenezu i održavanje populacije tumorskih matičnih stanica (Yokobori i sur. 2017).



**Slika 4.** TGF- $\beta$  signalni put. Aktivira ga vezanje liganda na receptor tipa II koji potiče privlačenje i fosforilaciju receptora tipa I te stvaranje heterodimera. Fosforilirani receptor fosforilacijom aktivira Smad2 i Smad3 koji formiraju kompleks sa Smad4. Kompleks se transportira u jezgru gdje regulira ekspresiju ciljanih gena.

Preuzeto sa <http://sprout038.sprout.yale.edu/imagefinder/Figure.external?sp=SPMC3068308%2FPRI2011-620601.005&state:Figure=BrO0ABXcRAAAAAQAACmRvY3VtZW50SWRzcgARamF2YS5sYW5nLkludGVnZXIS4qCk94GHOAIAAUkABXZhbHVleHIAEGphdmEubGFuZy5OdWliZXKGrJUdC5TgiwIAAHhwABKhog%3D%3D>.

Gubitak mogućnosti odgovora na TGF- $\beta$  u nekim slučajevima dovodi do prelaska benignog u maligni fenotip (Derynck i Feng 1997). Gubitak signalizacije u fibroblastima dovodi do povećane proliferacije fibroblasta i luminalnog epitela prostate, što je povezano s razvojem preneoplastičnih lezija. Normalna signalizacija u fibroblastima inače ograničava njihovu proliferaciju *in vivo* (Bhowmick i sur. 2004). Gubitak ili smanjena ekspresija T $\beta$ RII (receptora tipa II) dovodi do povećanog rizika razvoja raka dojke (Novitskiy i sur. 2014). Povišene razine proteina signalnog puta opažene su i kod raka pluća, karcinoma jetre kao i gastrointestinalnog raka (Yokobori i sur. 2017).

Smad proteini, koji djeluju kao efektori TGF- $\beta$  signalizacije, istovremeno djeluju i kao tumor supresori. Njihova inaktivacija olakšava malignu progresiju tumora, posebice kod

karcinoma gušterače (Derynck i Feng 1997). Smad proteini nemaju enzimatsku aktivnost pa nema amplifikacije signala, stoga su stanični odgovori osjetljivi na male promjene u ekspresiji. Oni međudjeluju s proteinima koji mogu acetilirati i deacetilirati histonske repove i na taj način modificirati transkripciju remodeliranjem kromatina (de Caestecker i sur. 2000).

## **5.2. Terapija i liječenje**

Klinička su istraživanja pokazala kako ciljano djelovanje na TGF- $\beta$  signalni put njegovom inhibicijom predstavlja učinkovitu strategiju protiv ponovne pojave tumora, ali da postoje nuspojave u obliku malignih tvorbi kože. Budući pristupi trebali bi ciljano djelovati na karcinogeni potencijal u stanicama bez inhibicije tumor supresorskog učinka TGF- $\beta$  (Yokobori i sur. 2017).

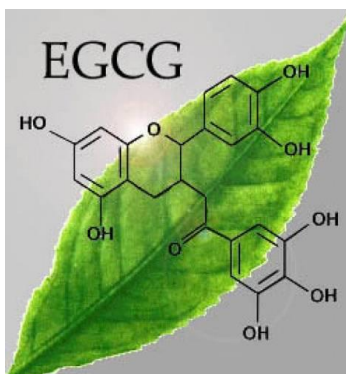


## 6. SPAJANJE UGODNOG S KORISNIM: ČAJ KAO OBLIK KEMOPREVENCIJE TUMORA

Čajni polifenoli čine jednu trećinu mase suhog biljnog materijala. Istraživanja su pokazala kako postoji korelacija između konzumacije čaja i nižeg rizika nekoliko različitih tipova raka, među kojima su rak jednjaka, pluća (Lin i sur. 1999), kože, dojke, jetre, prostate, debelog crijeva i dr. (Khan i sur. 2006). Polifenoli pokazuju širok spektar djelovanja koja uključuju inhibiciju stanične proliferacije, indukciju apoptoze, zaustavljanje staničnog ciklusa i antioksidativnu aktivnost. Djeluju inhibirajuće na razvoj, invaziju i metastaziranje malignih tumora (Lin i sur. 1999).

Reaktivne kisikove vrste (ROS od engl. *Reactive oxygen species*) jedan su od čimbenika uključenih u nastanak tumora. Smatra se kako je njihov kancerogeni potencijal povezan s promocijom tumora. Aktivno sudjeluju u metaboličkoj aktivaciji prokarcinogena, a zajedno s aktivacijom mitotskih signala ključni su čimbenici u karcinogenezi (Lin i sur. 1999).

EGCG ((-)-epigalokatehin-3-galat), kemijske strukture prikazane na Slici 5., jedan od glavnih polifenola u čaju, suprimira staničnu proliferaciju kao i prijenos izvanstaničnih signala, što rezultira svojevrsnom zaštitom u svim stupnjevima karcinogeneze, od inicijacije do progresije (Lin i sur. 1999). U tumorskim stanicama inducira apoptozu, štiteći organizam od neoplastičnog razvoja uklanjanjem genetički oštećenih stanica ili stanica u kojima je regulacija staničnog ciklusa poremećena (Khan i sur. 2006).



**Slika 5.** Kemijska struktura EGCG-a. Preuzeto sa <https://hubpages.com/health/The-EGCG-stack>.

Postoji velika vjerojatnost kako EGCG modulira regulatorne proteine G1 faze staničnog ciklusa kao što su ciklin ovisne kinaze. Također može blokirati indukciju sintaze dušične kiseline (iNOS, od engl. *Inducible nitric oxide synthase* ) u makrofagima (Lin i sur. 1999). Inhibira kimotripsinsku aktivnost proteasoma što se povezuje s indukcijom apoptoze u tumorskim stanicama, a ima i antiangiogena svojstva (Khan i sur. 2006).

Potrebno je napomenuti kako su rezultati istraživanja dobiveni korištenjem visokih koncentracija EGCG-a u staničnim kulturama kakve nisu prisutne u plazmi nakon ispijanja čaja, ali kako kontinuirana upotreba može dovesti do njegova gomilanja u koncentracijama koje su dovoljne za mjerljivi učinak (Khan i sur. 2006).

## 7. ZAKLJUČAK

Problemi koji se javljaju u liječenju tumora najvećim dijelom proizlaze iz sposobnosti tumorskih stanica da odgovore na terapiju prilagodbom ili odabirom rezistentnih klonskih linija (Rizzo i sur. 2008). Istraživanja su pokazala kako su signalni putevi u nastanku tumora međusobno povezani u mreži kompleksnih međureakcija receptora signala, enzima i transkripcijskih faktora te kako su mehanizmi kontrole stanične sudbine često redundantni. Ukoliko dođe do inaktivacije gena ili njegovog proteinskog produkta, velika je vjerojatnost da će neki drugi moći obavljati sličnu funkciju što otežava ciljane terapije (Rizzo i sur. 2008).

Kemoterapija ponekad ima ograničene učinke, kako zbog otpornosti na lijekove, tako i zbog toksičnosti za same organske sustave, stoga je razvoj novih strategija u liječenju ciljanjem ključnih signalnih puteva povezanih s tumorima imperativ (Miyamoto i sur. 2013).

Inicijacija tumora nepovratan je proces, za razliku od dugotrajne reverzibilne promocije, stoga taj stadij daje bolje mogućnosti blokiranja razvoja tumora (Lin i sur. 1999). Kemoprevencija, kao kontrola pojavnosti tumora blokiranjem, usporavanjem ili preokretom razvoja bolesti, koristi primjenu prirodnih ili sintetskih spojeva. Narušena stanična signalizacija prisutna kod tumora rezultira poremećenom staničnom funkcijom. Kemoprevencija ciljanjem poremećenih signalnih kaskada stoga je racionalan pristup sprječavanja pojave tumora (Khan i sur. 2006).

Razumijevanje staničnih signalnih puteva i poremećaja koji dovode do karcinogeneze nužno je za razvoj učinkovitijih metoda borbe protiv bolesti. Prevensija tumora u ljudi ovisna je o rezultatima istraživanja na staničnim kulturama, međutim javlja se potreba za *in vivo* istraživanjima, zajedno s kliničkim istraživanjima kako bi se otkrila primjenjivost tih metoda (Khan i sur. 2006).

## 8. LITERATURA

1. Aberger F., Hutterer E., Sternberg C., del Burgo P.J., Hartmann T.N. 2017 Acute myeloid leukemia – strategies and challenges for targeting oncogenic Hedgehog/GLI signaling. *Cell Communication and Signaling* 15: 8 doi: 10.1186/s12964-017-0163-4
2. Basu S., Haase G., Ben-Ze'ev A. 2016 Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis *F1000Research* 5: F1000 Faculty Rev-699 doi: 10.12688/f1000research.7579.1
3. Bhowmick N.A., Chytil A., Plieth D., Gorska A.E., Dumont N., Shappell S., Washington M.K., Neilson E.G., Moses H.L. 2004 TGF-  $\beta$  Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia *Science* **303**, 848-851
4. Capaccione K.M., Pine S.R. 2013 The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* **34**, 1420-1430
5. De Caestecker M.P., Piek E., Roberts A.B. 2000 Role of Transforming Growth Factor-  $\beta$  Signaling in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1388-1402
6. Derynck R., Feng X.H. 1997 TGF- $\beta$  receptor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1333** 105-150
7. Dormoy V., Béraud C., Lindner V., Coquard C., Barthelmebs M., Brasse D., Jacqmin D., Lang H., Massfelder T. 2012 Vitamin D3 triggers antitumor activity through targeting hedgehog signaling in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **33**, 2084-2093
8. Dumont A.G., Yang Y., Reynoso D., Katz D., Trent J.C., Hughes D.P. 2012 Anti-tumor effects of the Notch pathway in gastrointestinal stromal tumors. *Carcinogenesis* **33**, 1674-1683
9. Guo H., Lu Y., Wang J., Liu X., Keller E.T., Liu Q., Zhou Q., Zhang J. 2014 *Thoracic Cancer* **5**, 473-486

10. Gupta S., Takebe N., LoRusso P. 2010 Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **2**, 237-250
11. Kasper M., Jaks V., Fiaschi M., Toftgard R. 2009 Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis* **30**, 903-911
12. Katoh M., Katoh M. 2007 WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clinical Cancer Research* **13**, 4042-4045
13. Kelleher F.C. 2011 Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **32**, 445-451
14. Khan N., Afaq F., Saleem M., Ahmad N., Mukhtar H. 2006 Targeting Multiple Signaling Pathways by Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate. *Cancer Research* **66**, 2500-2505
15. Lecarpentier Y., Claes V., Vallée A., Hébert J.L. 2017 Interactions between PPAR Gamma and the Canonical Wnt/Beta-Catenin Pathway in Type 2 Diabetes and Colon Cancer. *PPAR Research* 2017:5879090. doi: 10.1155/2017/5879090
16. Li J., Ji L., Chen J., Zhang W., Ye Z. 2015 Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Skin Carcinogenesis and Therapy. *BioMed Research International* 2015:964842. doi: 10.1155/2015/964842
17. Liao X., Siu M.K.Y., Au C.W.H., Wong E.S.Y., Chan H.Y., Ip P.P.C., Ngan H.Y.S., Cheung A.N.Y. 2009 Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis* **30**, 131-140
18. Lin J.K., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y. 1999 Cancer Chemoprevention by Tea Polyphenols through Mitotic Signal Transduction Blockade. *Biochemical Pharmacology* **58**, 911-915

19. Ma X., Chen K., Huang S., Zhang X., Adegboyega P.A., Evers B.M., Zahng H., Xie J. 2005 Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis* **26**, 1698-1705
  
20. Miyamoto S., Nakanishi M., Rosenberg D.W. 2013 Supression od colon carcinogenesis by targeting Notch signaling. *Carcinogenesis* **34**, 2415-2423
  
21. Novellademunt L., Antas P., Li V.S.W. 2015 Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* **309** 511-521
  
22. Novitskiy S.V., Forrester E., Pickup M.W., Gorska A.E., Chytil A., Aakre M., Polosukhina D., Owens P., Yusupova D.R., Zhao Z., Ye F., Shyr Y., Moses H.L. 2014 Attenuated transforming growth factor beta signaling promotes metastasis in a model of HER2 mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 16(5):425. doi: 10.1186/s13058-014-0425-7
  
23. Polakis P. 2012 Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(5): a008052 doi: 10.1101/cshperspect.a008052
  
24. Qiao L., Wong B.C.Y. 2009 Role of Notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis* **30**, 1979-1986
  
25. Rizzo P., Osipo C., Foreman K., Golde T., Osborne B., Miele L. 2008 Rational targeting of Notch signaling in cancer *Oncogene* **27**, 5124-5131
  
26. Robert J. 2010. Texbook of Cell Signalling in Cancer: An Educational Approach. Springer-Verlag France, Paris, pp. i-xxii

27. Sicklick J.K., Li Y.X., Jayaraman A., Kannangai R., Qi Y., Vivekanandan P., Ludlow J.W., Owzar K., Chen W., Torbenson M.S., Diehl A.M. 2006 Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **27**, 748-757
  
28. Yokobori T., Nishiyama M. 2017 TGF- $\beta$  Signaling in Gastrointestinal Cancers: Progress in Basic and Clinical Research. *Journal of Clinical Medicine* 6(1): 11  
doi: 10.3390/jcm6010011
  
29. Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. 2017 Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **36**, 1461-1473
  
30. <http://www.encyclopedia.com/medicine/diseases-and-conditions/pathology/carcinogenesis>
  
31. <https://hubpages.com/health/The-EGCG-stack>
  
32. <http://www.med-college.de/en/wiki/artikel.php?id=43>
  
33. <http://www.rockland-inc.com/cell-signaling-pathways.aspx>
  
34. <http://sprout038.sprout.yale.edu/imagefinder/Figure.external?sp=SPMC3068308%2FPI2011-620601.005&state:Figure=BrO0ABXcRAAAAAQAACmRvY3VtZW50SWRzcgARa mF2YS5sYW5nLkludGVnZXIS4qCk94GHOAIAAUkABXZhbHVleHIAEGphdmEu bGFuZy5OdW1iZXKGrJUdC5TgiwIAAHhwABKhog%3D%3D>
  
35. [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling/wntsignaling.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html)

## 9. SAŽETAK

Karcinogeneza je kompleksan proces koji uključuje mnoge signalne puteve. Pogreške u aktivaciji pojedinog puta koje dovode do prekomjerne razine ekspresije ključnog proteina tog signalnog puta predmet su kontinuiranih znanstvenih istraživanja.

Ovaj seminar daje pregled najvažnijih signalnih puteva u karcinogenezi tumora i načina ciljanog djelovanja na njihove ključne komponente radi liječenja. Mnogi putevi mogu imati poticajući učinak na karcinogenezu, međutim ovisno o staničnom kontekstu otkriveno je kako mogu i suprimirati inicijaciju tumora.

Kemoprevencija sintetskim i prirodnim spojevima jedna je od mjera sprječavanja nastanka tumora. Liječenje ciljanim terapijama u kojima bi se kao meta odabirali pojedini ključni proteini uključenih signalnih puteva zahtijeva daljnja istraživanja. Cilj je pronaći metode koje bi dovele do inhibicije rasta ili umiranja malignih stanica, bez štetnog utjecaja na zdrave stanice organizma.

## 10. SUMMARY

Carcinogenesis is a complex process involving many signaling pathways. Activation dysregulation of a distinctive pathway that leads to aberrant expression level or overexpression of a crucial protein in said signal pathway are a subject of continuous scientific research.

This seminar gives an overview of the most important signal pathways in tumor carcinogenesis and a way of targeted action on key components for the purpose of treatment. Many pathways have a positive effect on carcinogenesis, however, depending on cellular context, it has been discovered a tumor suppression also exists.

Chemoprevention by synthetic and natural compounds is a form of tumor prevention. Treatment by target therapies that select crucial proteins of activated signal pathways demands further research. The goal is to find methods that inhibit growth or lead to malignant cell death without affecting the organism's healthy cells.